

# **Isolierung der Phospho- und Glykolipide aus Streptococcus lactis**

von

**Rolf Dieter Schmid**

aus

**Nürnberg**

1971 № 252



Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut  
der Universität Erlangen-Nürnberg  
Vorstand: Professor Dr. W. Kersten

---

# **Isolierung der Phospho- und Glykolipide aus *Streptococcus lactis***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

**Rolf Dieter Schmid**

aus

**Nürnberg**

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät  
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Schiefer  
Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Fischer  
Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 4. 1971

Inhaltsverzeichnis

|                                                  | Seite   |
|--------------------------------------------------|---------|
| Einleitung                                       | 3       |
| Ergebnisse                                       | 4 - 9   |
| 1. Trennung und Reinigung der Lipide             | 5 - 7   |
| 2. Untersuchungen an den isolierten Verbindungen | 8 - 9   |
| Diskussion                                       | 10 - 12 |
| Methodischer Teil                                | 13 - 18 |
| 1. Materialien                                   | 13      |
| 2. Züchtung der Bakterien                        | 13      |
| 3. Extraktion und Reinigung der Gesamtlipide     | 13      |
| 4. Trennung der Lipide                           | 14      |
| 5. Färbungen                                     | 18      |
| 6. Analyse der gereinigten Lipide                | 18      |
| Zusammenfassung                                  | 19 - 20 |
| Literatur                                        | 21      |
| Lebenslauf                                       | 22      |

### Einleitung

1968 wurde erstmals unabhängig von zwei Arbeitsgruppen das Vorkommen eines Phosphoglykolipids in *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*(1) und *Streptococcus haemolyticus* (2) beobachtet, dessen Struktur nicht definitiv geklärt worden war. Mit diesem neuen Lipid waren frühere orientierende Untersuchungen über die Lipide von Streptococcen hinsichtlich ihrer Vollständigkeit in Frage gestellt (3).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Lipide aus *S.lactis* unter besonderer Berücksichtigung des neuen Phosphoglykolipidtyps zu isolieren und damit einer exakten Strukturanalyse zugänglich zu machen. Die Lipide der Streptococcen verdienen besonderes Interesse, da sie nicht Reservestoffe darstellen sondern fast ausschließlich als Bausteine der Cytoplasmamembran fungieren.(4)

An den gereinigten Lipiden wurden Bausteinanalysen durchgeführt um die Reinheit der isolierten Verbindungen zu prüfen und Anhaltspunkte über den molekularen Bau zu gewinnen. Die ausführlichen sich anschließenden Strukturanalysen werden in anderem Zusammenhang beschrieben.

### Ergebnisse

Die Lipide wurden durch Aufschluß der Bakterien mit Chloroform / Methanol 2:1(v/v) gewonnen und durch anschließende Chromatographie über eine Sephadexsäule von wasserlöslichen Verbindungen befreit. Die Gesamtlipidmenge betrug 0,9g pro 100g Bakterienfeuchtgewicht. Dünnschichtchromatographisch zeigte der Extrakt drei kohlenhydrathaltige Verbindungen Abb.1 (1,2,6) vier Phospholipide Abb. 1: (3 bis 6) und mehrere ninhydrinpositive Substanzen von denen nur eine einen positiven Phosphatnachweis ergab (Abb. 1)

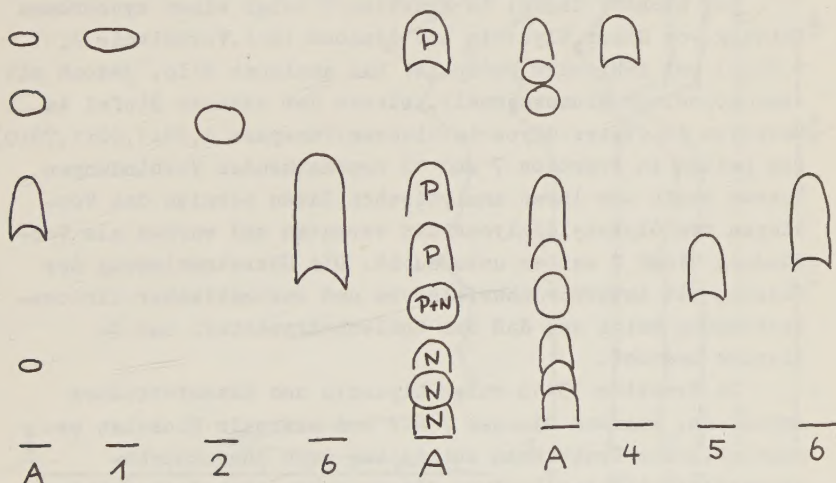


Abb.1: Dünnschichtchromatographie des Lipidextrakts aus *S.lactis*(A) und der gereinigten Lipide 1,2,4 - 6.

Kieselgel G, aktiviert ,Chloroform-Methanol-Wasser 65:35:4  
Färbung: rechts mit Joddampf, links mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure. Bei Färbung mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure erschienen nur die Verbindungen 1,2,6 in der für Zucker charakteristischen Rotfärbung. Die übrigen sichtbaren Flecken waren grau gefärbt (Pigmente).Die Schemazeichnung (Mitte) gibt die phosphatpositiven (P) und ninhydrinpositiven Verbindungen(N) für die Gesamtlipide wieder.

## Trennung und Reinigung der Lipide

### 1. Fraktionierung über DEAE-Cellulose:

Der Lipidextrakt wurde über DEAE-Cellulose, Acetatform, mit einem diskontinuierlichen Chloroform-Methanol-Gradienten fraktioniert (Abb.2).

Der erste Gipfel, der nicht weiter untersucht wurde, ließ mit der Hydroxamatmethode nachweisbare Ester, aber relativ wenig Glycerin erkennen, so daß es sich nicht um Triglyceride handeln kann.

Der nächste Gipfel in Fraktion 7 zeigt einen synchronen Anstieg von Ester, Glycerin und Glucose (mol. Verhältnis 2,1: 1,05:1) bei fehlendem Phosphat. Ein analoges Bild, jedoch mit etwa doppeltem Glucoseanteil, bietet der nächste Gipfel in Fraktion 12 (Ester:Glycerin:Glucose:Phosphat 1,88:1,00:1,75:0). Die beiden in Fraktion 7 und 12 erscheinenden Verbindungen lassen somit aus ihren analytischen Daten bereits das Vorliegen von Glykosyldiglyceriden vermuten und wurden als Verbindung 1 und 2 weiter untersucht. Die Übereinstimmung der Messung mit Anthron-Schwefelsäure und enzymatischer Glucosebestimmung zeigt an, daß der Kohlenhydratanteil aus D-Glucose besteht.

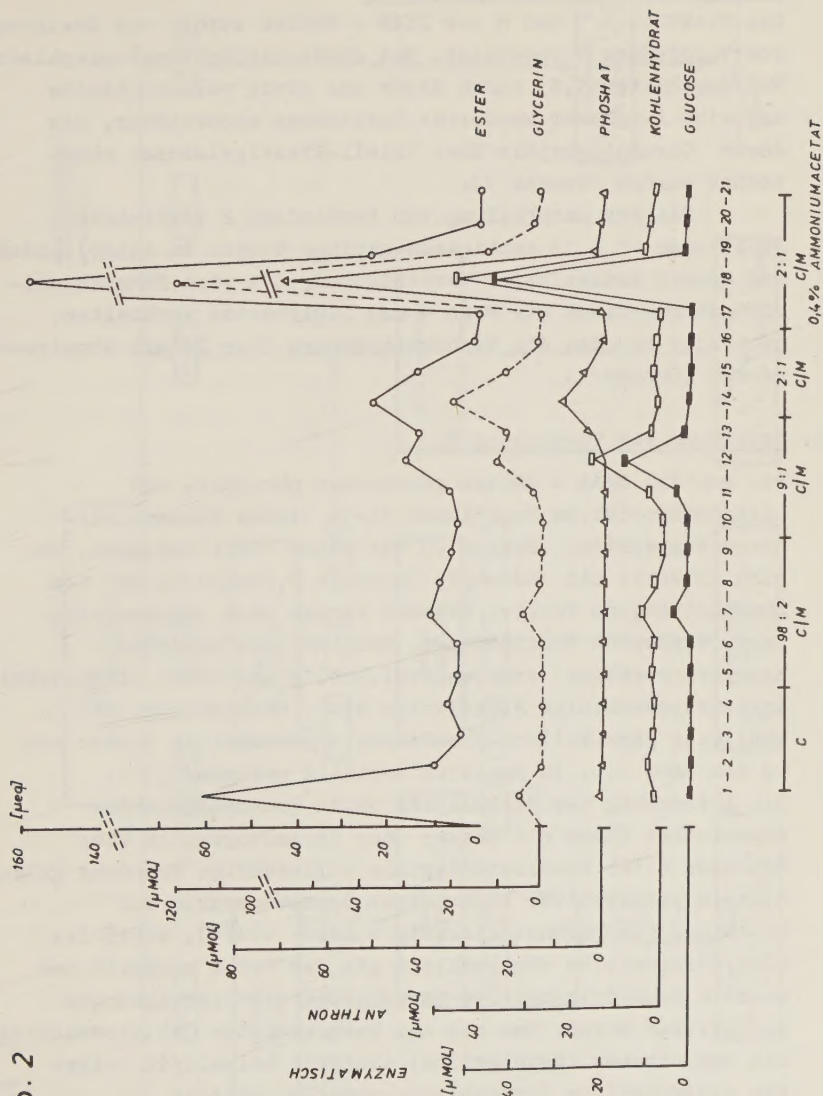
In Fraktion 13-16 stieg Glycerin und Esterfettsäure erneut an, während Glucose fehlt und erstmals Phosphat erscheint. Diese Fraktionen enthielten nach dünnschichtchromatographischer Prüfung die gesamten ninhydrinpositiven Substanzen (vgl. Abb.1), von denen die phosphatpositive als Verbindung 3 weiter gereinigt und analysiert wurde.

Zusatz von Ammoniumacetat zum Elutionsmittel führte im Eluat zu einem Anstieg von Ester, Glycerin, Glucose und Phosphat. Die drei darin enthaltenen ninhydrinnegativen Verbindungen 4-6 (Dünnschichtchromatographie, System 2) lassen bei der Elution keine Tendenz zur Trennung erkennen (Abb.2).

Auch hier besteht der Kohlenhydratanteil nur aus D-glucose. Wie Abb.2 zeigt, stellen diese drei Verbindungen den Hauptanteil der Lipide aus *S.lactis*.

Die Säulenfüllungen und Elutionsschemata werden im methodischen Teil (S.14-17) beschrieben.

Abb. 2



## 2. Reinigung von Verbindung 1 und 2

Die Fraktionen 7 und 8 der DEAE - Säulen wurden zur Gewinnung von Verbindung 1 vereinigt. Bei dünnsschichtchromatographischer Prüfung (System 1,3) waren Reste der wenig polaren Lipide und eine langsamer wandernde Verbindung nachweisbar, die durch Chromatographie über Unisil-Kieselgelsäulen abgetrennt wurden (Schema 1).

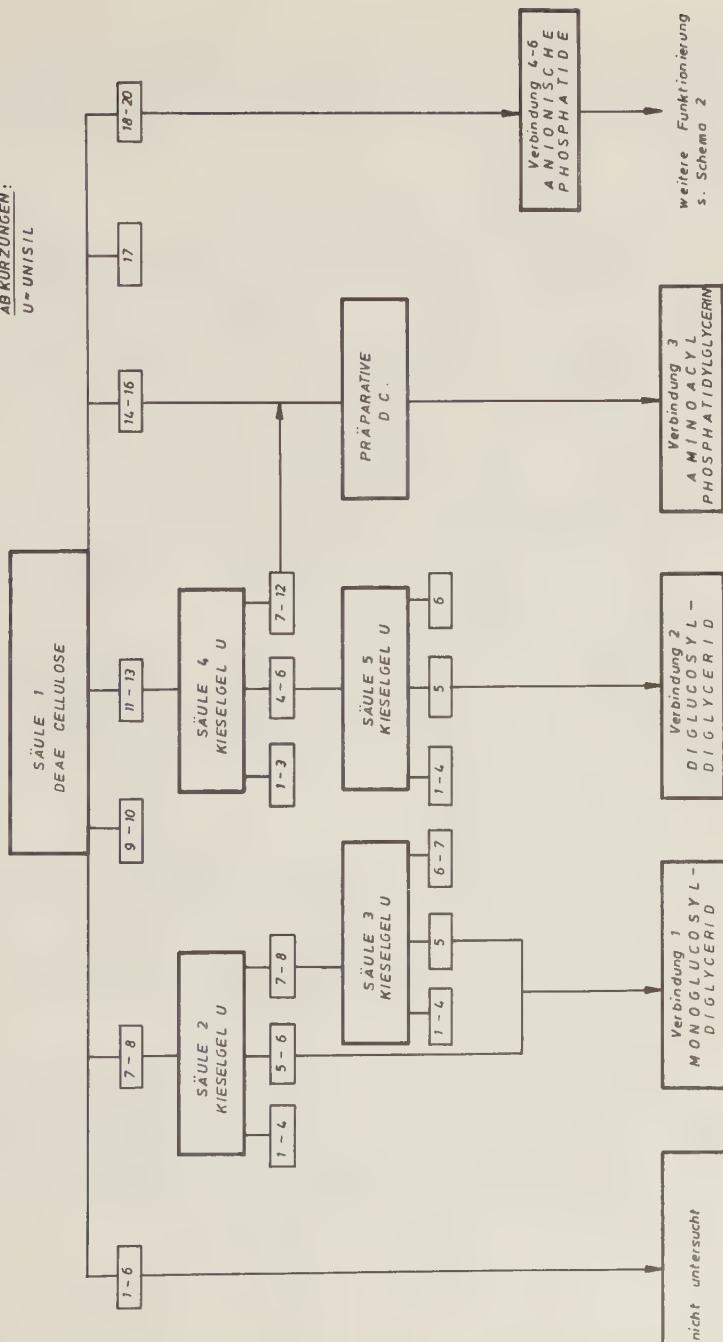
Die zur Darstellung von Verbindung 2 vereinigten Fraktionen 11 - 13 enthielten geringe Mengen an Aminolipiden und Spuren zuckerfreier Verbindungen, die sich dünnsschichtchromatographisch wie Mono - und Diglyceride verhielten. Auch hier konnten die Verunreinigungen über Unisil abgetrennt werden (Schema 1).

## 3. Reinigung von Verbindung 3

Die aus den DEAE - Säulen gewonnenen phosphat- und ninhydrinpositiven Fraktionen 14-16 ließen dünnsschichtchromatographisch (System 2) nur einen Fleck erkennen, der sich intensiv mit Joddampf, Rhodamin G, Ninhydrin und dem Phosphatreagenz färbte. Daneben fanden sich mehrere langsamer wandernde Verbindungen, die nur eine positive Ninhydrinreaktion ergaben (vgl. Abb.1) und somit offensichtlich aminogruppenhaltige Nichtlipide sind. Verbindungen mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wurden von Op den Kamp c.s. in *Bacillus subtilis* gefunden (5). Die Abtrennung der Nichtlipide durch Ausschütteln der organischen Phase mit Wasser oder Chromatographie über Sephadex blieb unvollständig. Die vollständige Trennung gelang mittels präparativer Dünnsschichtchromatographie auf Cellulose (Isobutanol/Eisessig/Wasser 4:1:1), wobei das ninhydrinpositive Phospholipid mit der Front wanderte und mehrere ninhydrinpositive phosphatnegative Verbindungen nachweisbar waren. Das aus der ausgekratzen Celluloseschicht mit organischem Lösungsmittel eluierte Aminolipid zeigte die ursprüngliche dünnsschichtchromatographische Wanderungsgeschwindigkeit (System 2) und war einheitlich.

# SCHEMA 1

AB KÜRZUNGEN:  
U = UNISIL



Während vor der Trennung nach Säurehydrolyse sämtliche in Proteinen vorkommende Aminosäuren nachweisbar waren, wurden nach der Reinigung neben Spuren von Alanin, Serin und Glycin vorwiegend Lysin (85% des  $\alpha$ -Aminostickstoffs) gefunden.

#### 4. Trennung und Reinigung der Verbindungen 4 - 6

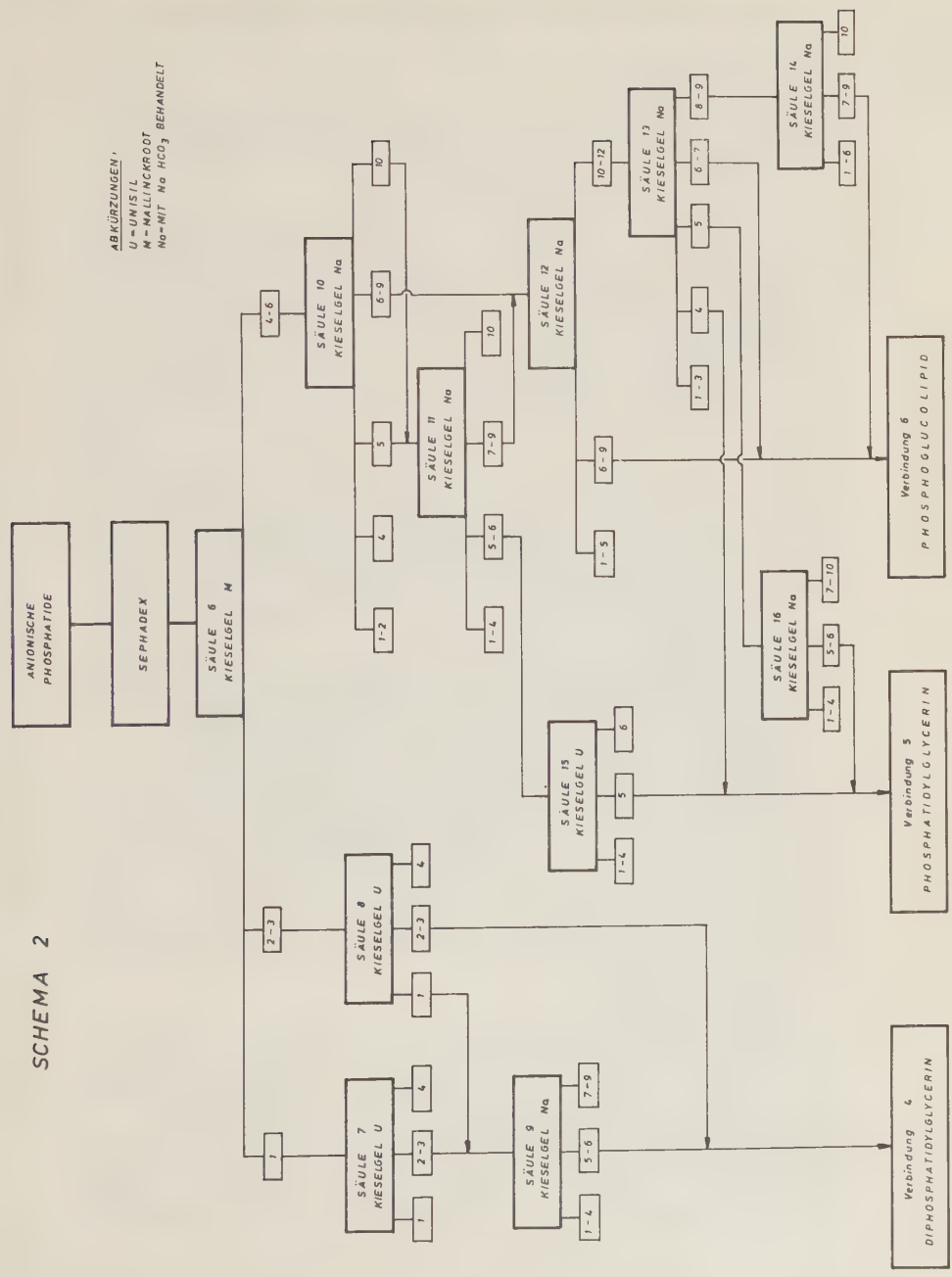
Die Fraktionierung der anionischen Phosphatide ist in Schema 2 zusammengestellt. Die aus den DEAE-Säulen in Fraktion 18 - 20 erhaltenen anionischen Phosphatide wurden zunächst durch Säulenchromatographie über Sephadex (9) von restlichem Ammoniumacetat befreit. Die nachfolgende Säulenchromatographie über Kieselgel (Mallinckrodt) führte zur Abtrennung der Hauptmenge von Verbindung 4, die mit Chloroform und geringen Zusätzen von Methanol (98:2, 95:5) eluiert wurde (Säule 6, Fraktion 1-3). Mit polareren Elutionsmittelverhältnissen, Chloroform/Methanol 6:1 bis 3:1, erschien zunächst Verbindung 6, jedoch so geringfügig gegen Verbindung 5 versetzt (Fraktion 4 bis 6), daß sich hierauf keine Trennung aufbauen ließ.

Die aus Säule 6 gewonnene Verbindung 4 war noch mit pigmentartigen Verbindungen verunreinigt, die durch Chromatographie über Unisil (Säule 7 und 8), mit mehr Erfolg über mit Natriumbicarbonat behandeltes Kieselgel (Säule 9) abgetrennt werden konnten, wonach Verbindung 4 in chromatographisch reiner Form vorlag (Abb.1).

Die Trennung von Verbindung 5 und 6 gelang ebenfalls über mit Natriumbicarbonat behandeltes Kieselgel (Säule 10). Hierbei erschien bei Elution mit Chloroform/Methanol 6:1 Verbindung 5 so weit vor Verbindung 6, daß durch viermalige Rechromatographie im selben System (Säule 11-14) Verbindung 6 in chromatographisch reiner Form erhalten wurde (Abb.1). Die aus Säule 11 erhaltene Hauptmenge an Verbindung 5 wurde über Chromatographie an Unisil von geringen Beimengungen an Verbindung 4 und 6 befreit (Säule 15). Geringe Mengen wurden aus Säule 13 erhalten, die zum Teil über Natriumbicarbonat behandeltes Kieselgel nachgereinigt werden mußten (Säule 16). Die so erhaltene Verbindung 5 war chromatographisch einheitlich (Abb.1).

# SCHEMA 2

ABKÜRZUNGEN:  
 U = UNISIL  
 M = MALLINCKRODT  
 Na = MIT Na HCO<sub>3</sub> BEHANDELT



## Untersuchungen an den isolierten Verbindungen

### 1. Bausteinanalysen

Die sechs getrennten Verbindungen wurden auf ihre molekulare Zusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 4 wiedergegeben.

Die gefundenen molaren Verhältnisse der Bausteine lassen für Verbindung 1 und 2 auf ein Mono - bzw. Diglucosyldiglycerid schließen (Tab.1). Diese und ähnlich gebaute Verbindungen sind charakteristische Bestandteile grampositiver Bakterien (3 ).

In Verbindung 3 (Tab2) sprechen die nachgewiesenen Bausteine und ihre molaren Verhältnisse für ein Lipid vom Typ eines Aminoacylphosphatidylglycerins ( 8 ). Die Esterbindung der Aminosäuren wird durch die besondere Alkalilabilität bestätigt (Boratpuffer, pH 9 ). Die Aminosäuren bestehen vorwiegend aus Lysin(85%) und geringen Mengen an Glycin, Alanin und Serin. Nach der milden Alkalihydrolyse trat eine chromatographisch mit Phosphatidylglycerin identische Verbindung auf, an der die Anzahl der Fettsäuren pro Molekül ermittelt wurde.

Die molaren Verhältnisse der Bausteine in den Verbindungen 4 und 5 sind charakteristisch für Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin) und Phosphatidylglycerin (Tab.3).

Verbindung 6, deren Bausteinanalyse in Tab.4 gegeben wird, entsprach dem in der Einleitung erwähnten neuen Phosphoglykolytyp, so daß die molaren Verhältnisse der Bausteine noch keinen Hinweis auf den molekularen Bau liefern konnten. Eine Verbindung gleicher Zusammensetzung, jedoch mit nur zwei Esterfettsäuren wurde aus Streptococcus haemolyticus (GruppeA) isoliert (2).

### 2. Molekulargewichte

In den Tabellen sind außer den molaren Verhältnissen der Verbindungen die aus Bausteinanalyse und Wägung empirisch ermittelten Molekulargewichte im Vergleich zu den berechneten wiedergegeben. Für die Berechnung des niedrigeren Wertes wurde jeweils Palmitinsäure, für die höheren Stearinsäure eingesetzt, da die Streptococcenlipide hauptsächlich

16- und 18-C Fettsäuren enthalten (2).

Für Verbindung 1 und 2 liegen die gefundenen Molekulargewichte im Bereich der berechneten, für die Phosphatide etwa 10% höher, was auch andere Untersucher fanden (2). Die Ursache hierfür dürfte darin liegen, daß die Phosphatide nicht als freie Säuren sondern in Salzform vorliegen.

### 3. Reinheit der Verbindungen

Die praktisch ganzzahligen Verhältnisse der Molekülbausteine sämtlicher Verbindungen sowie die hinreichende Übereinstimmung von berechneten und gefundenen Molekulargewichten bestätigen die chromatographisch gefundene Einheitlichkeit der Verbindungen.

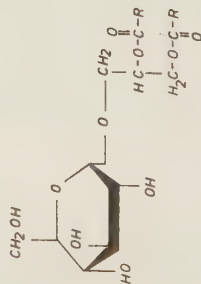
### 4. Struktur

Die unter den Tabellen wiedergegebenen Strukturen wurden später durch verschiedene Abbautechniken ermittelt(6,7). Sie stimmen für die Verbindungen 1 bis 5 mit den aus den molaren Zusammensetzungen postulierten Strukturen überein.

Verbindung 6 enthält an jedem Glycerinanteil mindestens einen Fettsäurerest. Falls der dritte am Glycerin des Diglucosylglycerinanteils lokalisiert ist, kann Verbindung 6 als Derivat von Verbindung 2 gelten. Unter dieser Annahme ordnen sich die Verbindungen 1,2 und 6 zu einer Biosynthesereihe, während die Verbindungen 3,4 und 5 eine zweite darstellen, die ihren Ausgangspunkt in Verbindung 5 hat.

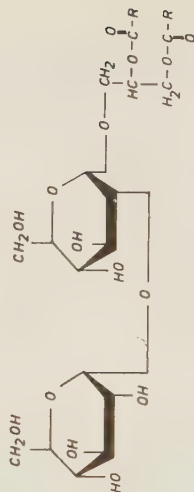
TAB. 1

| VERBINDUNG | MOLARES VERHÄLTNIS |  | KOHLENHYDRAHT | GLUCOSE | GLYZERIN | ESTER | MOL. GEW. |      |
|------------|--------------------|--|---------------|---------|----------|-------|-----------|------|
|            | $\mu$ MOL / mg     |  |               |         |          |       | GEF.      | BER. |
| 1          |                    |  | 0,98          | 1,00    | 1,03     | 1,96  | 793       |      |
|            |                    |  | 1,26          | 1,28    | 1,33     | 2,48  | 730-786   |      |
| 2          |                    |  | 2,10          | 2,00    | 1,02     | 1,91  | 770       |      |
|            |                    |  | 2,16          | 2,05    | 1,05     | 1,96  | 892-978   |      |



Verbindung 1

O- $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYL -  
(1 $\rightarrow$ 1) DIGLYCERID

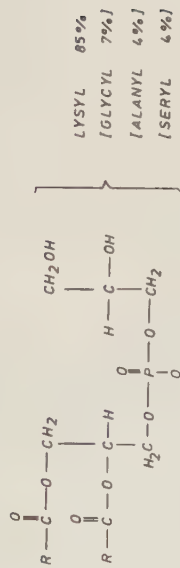


Verbindung 2

O- $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYL-(1 $\rightarrow$ 2) -  
O- $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYL-(1 $\rightarrow$ 1)  
DIGLYCERID

TAB. 2

| VERBINDUNG 3        | PHOSPHAT | GLYCERIN | AMINOSÄUREN |
|---------------------|----------|----------|-------------|
| MOLARES VERHÄLTNISS | 1,0      | 2,1      | 1,1         |

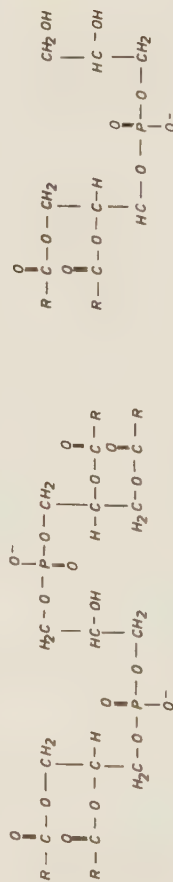


Verbindung 3:

AMINOACYL PHOSPHATIDYL → GLYCERIN

TAB. 3

| VERBINDUNG | MOLARES VERHÄLTNIß<br>µMOL/mg | ESTER       | GLYCERIN    | PHOSPHAT    | MOL. GEW.                   |
|------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| 4          |                               | 1,9<br>2,31 | 1,5<br>1,87 | 1,0<br>1,25 | GEF. 1653<br>BER. 1424-1536 |
| 5          | n                             | 2,0<br>2,32 | 2,0<br>2,36 | 1,0<br>1,16 | GEF. 857<br>BER. 722-778    |



Verbindung 4:

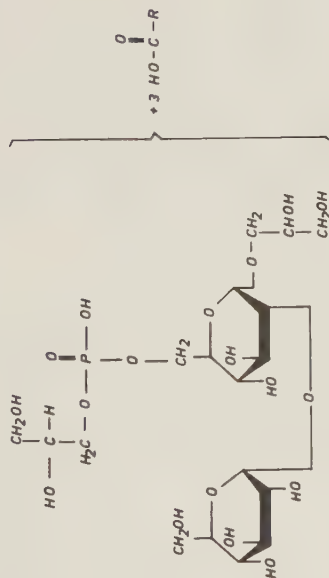
DIPHOSPHATIDYLGLYCERIN

Verbindung 5:

PHOSPHATIDYLGLYCERIN

TAB. 4

| VERBINDUNG | KOHLHYDRAT | GLUCOSE | GLYCERIN | ESTER | PHOSPHAT | MOL. GEW       |
|------------|------------|---------|----------|-------|----------|----------------|
| 6          | 2,06       | 2,00    | 2,03     | 3,01  | 1,01     | GEF. 1552      |
|            | 1,32       | 1,28    | 1,30     | 1,93  | 0,65     | BER. 1302-1386 |



Verbindung 6.1

TRI-O-ACYL DERIVAT von 1-O-(6'-(sn-GLYCERO-3''-PHOSPHORYL)-2'-O-( $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYL)- $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYL]-GLYCERIN

### Diskussion

Da für die primäre Fraktionierung der Gesamtlipide die Säulenchromatographie über Kieselgel den Nachteil hat, daß Diphosphatidylglycerin zum Teil mit den nichtionischen Phospholipiden erscheint(2) und aminogruppenhaltige Lipide von den anionischen Phospholipiden nur unvollständig getrennt werden (2), wurde die Chromatographie über DEAE Cellulose (Acetat-form) gewählt. Abbildung 2 zeigt die gute Fraktionierung in wenig polare, polare, zwitterionische und anionische Lipide.

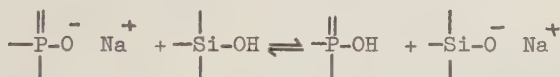
Der Grund hierfür liegt in der kombinierten Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie. Die Adsorption erfolgt im apolaren Milieu, mit dem das Lipidgemisch auf die Säule gebracht wird, über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Cellulose und polaren Gruppierungen der Lipidmoleküle. Dementsprechend wurden die nicht polaren oder nur schwach polaren Lipide bereits mit Chloroform eluiert. Das durch seine Glucosegruppe polare Monoglucosyldiglycerid erschien bei Zusatz von 2% Methanol(in Chloroform) im Eluat, während das polarere Diglucosyldiglycerid in Übereinstimmung mit obiger Vorstellung erst auf Zusatz von 10% Methanol eluiert wurde. Dabei verdrängt das für die Polarität im Fließmittel hauptsächlich verantwortliche Methanol die jeweilige Verbindung von den Adsorptionsstellen.

Die Phospholipide werden zunächst durch Ionenaustausch gegen das Acetation in die protonierten Aminogruppen der Diaethanolaminoäthanolreste in Salzbindung fixiert. Da die Elution bei der Ionenaustauschchromatographie von der Nettoladung abhängig ist und diese Lipide vom Typ des Aminoacylphosphatidylglycerins auf Grund der Aminogruppe null ist, wird verständlich, daß diese Verbindung ohne verdrängendes Gegenion bei entsprechend hoher Polarität des Elutionsmittels (33% Methanol) im Eluat erscheint.

Die anionischen Phosphatide ,Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin und das Phosphoglucolipid bleiben hierbei aufgrund ihrer negativen Nettoladung gebunden. Zur Elution ist ein Ionenzusatz (Ammoniumacetat) notwendig, um sie über Anionenaustausch von den Bindungsstellen zu verdrängen.

Eine Fraktionierung innerhalb dieser Gruppe ist trotz vorhandener Polaritätsunterschiede (Formeln in Tab. 3 und 4) nicht möglich, da sich diese bei der hohen Polarität des Elutionsmittels nicht mehr auswirken können.

Das Hauptproblem stellte die weitere Trennung und Reinigung der anionischen Phosphatide dar. Auffallend war, daß auf Kieselgel Diphosphatidylglycerin relativ leicht eluierbar war, während das Phosphoglucolipid und Phosphatidylglycerin erst nach beträchtlicher Erhöhung der Lösungsmittelpolarität in dieser Reihenfolge, aber mit nur geringer Tendenz zur Trennung eluiert wurden. Da die beiden letzteren erhebliche Unterschiede in der Anzahl der Hydroxylgruppen aufweisen, nehmen wir an, daß diese für den Trennvorgang auf Kieselgel nicht ausschlaggebend sein können. Wir vermuten daher, daß für die Bindung die Phosphatdiestergruppe verantwortlich ist. Unabhängig davon in welcher Salzform sie aufgebracht wird, geht sie durch Ionenaustausch mit den oberflächlichen Siliciumhydroxydgruppen in die undissoziierte Form über



die dann durch Wasserstoffbrückenbindungen am Adsorbens fixiert wird. Die geringe Adsorption des Diphosphatidylglycerins erklärt sich aus dem Molekülmodell, das eine sterische Hinderung der Wechselwirkung zwischen den Phosphodiestergruppen und der adsorbierenden Oberfläche seitens der vier Fettsäurereste nahe legt.

Zur Trennung von Phosphatidylglycerin und dem Phosphoglucolipid mußte daher ein Trennsystem gefunden werden, in dem der Einfluß der Phosphodiestergruppe auf die Adsorption gering ist, so daß die Hydroxylgruppen den ausschlaggebenden Faktor bei der Bindung an das Adsorbens bilden. Als geeignet erschien uns mit Natriumhydrogencarbonat behandeltes Kieselgel, in dem die undissoziierten Siliciumhydroxydgruppen durch Natriumsilicatgruppen ersetzt sind und die Phosphatide im Gegensatz zu einfachem Kieselgel beim Trennvorgang in der Salzform vorliegen.

Dadurch ist ein abstoßender Effekt zwischen der negativen Ladung der Oberfläche und der Phosphatreste zu erwarten, womit die Affinität zum Adsorbens allein durch die Hydroxylgruppen bedingt wird. Entsprechend dieser Vorstellung wurde Phosphatidylglycerin(2 OH-Gruppen) vor dem Phosphoglucolipid (7 OH-Gruppen) eluiert, wodurch die endgültige Trennung dieser beiden Verbindungen erreicht wurde.

## Methodischer Teil

### Materialien

Alle Reagenzien wurden in p.a. Qualität verwendet. Sephadex G 25, coarse, wurde von Pharmacia, Uppsala, Schweden bezogen, DEAE-Cellulose GS von Serva, Heidelberg; Silicagel Unisil, p.a. von Clarkson Chemical Company, Williamsport, USA; Kieselgel, p.a., Mallinckrodt (-100 mesh) von Serva, Heidelberg; Kieselgel G von Merck, Darmstadt; Cellulose MN 300 von Machery und Nagel, Enzyme und Coenzyme von Boehringer, Mannheim.

### Züchtung der Bakterien

*Streptococcus lactis* (Stammkultur aus dem Bakteriologisch-Hygienischem Institut der Universität Erlangen-Nürnberg) wurde in einem Medium, das 1% Pepton, 1% Kaliumhydrogenphosphat, 0,3% Hefe und 0,5% Glucose enthielt, bei 32°C unter ständigem Schütteln ohne Belüftung 18 - 22 Stunden gezüchtet. Die stationäre Phase war nach etwa 8 Stunden erreicht, wonach der pH-Wert auf ein konstantes Niveau von 4,5 bis 4,2 abgesunken war. Die Ausbeute betrug im Mittel 3g Bakterien (Feuchtgewicht) pro Liter Medium. Insgesamt wurden 430g Bakterien gezüchtet. Die Bakterien wurden von der Nährlösung abzentrifugiert (3000 Upm, 40 Min) und mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen.

### Extraktion und Reinigung der Gesamtlipide

Die abzentrifugierten Bakterien wurden in wenig Methanol suspendiert, unter Kühlung im Potter-Elvehjem-Homogenisator aufgeschlossen. Pro 100g Bakterien (Feuchtgewicht) wurde Methanol durch weiteren Zusatz auf 500 ml ergänzt. Anschließend wurde bei 65°C unter Rühren 15 Min. erwärmt. Nach Abkühlen wurde mit 1000ml Chloroform versetzt 20 Min. gerührt und das Gemisch 18 bis 24 Stunden bei -20°C belassen. Der Lipidextrakt wurde durch Filtration über einen Büchner - Trichter von gefällttem Protein befreit. Der Rückstand wurde mit 600 ml Chloroform/Methanol (2:1) nachextrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden in N<sub>2</sub>-Atmosphäre im Vak. (Badtemp. ca. +5°C) zum Sirup eingedunstet. Ausbeute an Rohlipid: 1,29g pro 100g Bakterien (Feuchtgewicht); Gesamtmenge: 5,55g.

Der Lipidextrakt wurde in Chloroform-Methanol-Wasser 60.:30.:3,5 eben gelöst und durch Chromatographie über Sephadex von wasserlöslichen Bestandteilen befreit (9). Zur Reinigung von 1,2g Rohlipid wurden 42g Sephadex G25 coarse (Säule: 2cm Durchmesser, 20cm Höhe) verwendet. Eluiert wurde mit 250ml Chloroform-Methanol (2:1) bei einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/Min. Nacheluate erwiesen sich als lipidfrei. Ausbeute an gereinigtem Gesamtlipid: 3,67g, enthaltend 56,2mg P, 109,6mg Glucose.

## Trennung der Lipide

Nachfolgend werden die unter "Ergebnisse" in Schema 1 und 2 aufgeführten Säulen hinsichtlich Füllung und Elutionsfolge beschrieben.

Für die Lösungsmittel werden folgende Abkürzungen verwendet:

A = Aceton

C = Chloroform

M = Methanol

### Säule 1

Verwendung: Fraktionierung des Gesamtlipidextraktes. Es wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von Rouser c.s. verfahren (10). Pro 300-350mg Lipid wurden 15g gewaschene, in Acetatform überführte (10) DEAE-Cellulose verwendet. Säulen-Durchmesser 2cm; Füllhöhe 20cm. Das Lipid wurde, in C gelöst, auf die Säule gebracht. Das Elutionsschema ist für diesen Trennvorgang in Abb.2 wiedergegeben. Die Fraktionen wurden im Vak. zum Sirup eingengt und in einem definierten Vol. C zur quantitativen Analyse aufgenommen.

### Säule 2,3

Verwendung: Reinigung von Verbindung 1  
15g Unisil wurden 5 Std. bei 120°C aktiviert und, in C suspendiert, in die Säule (ø 2cm, Höhe 8cm) gefüllt. Pro Säule wurden etwa 50mg Lipid (enthaltend 11mg Glucose) eingesetzt. Das Lipid wurde, in C gelöst, aufgebracht.

#### Elutionsschema ( 1ml/min)

| Fr. Nr.        | 1 | 2          | 3          | 4          | 5          | 6 - 7 |
|----------------|---|------------|------------|------------|------------|-------|
| Vol:30ml       |   |            |            |            |            |       |
| Elutionsmittel | C | C/A<br>6:1 | C/A<br>4:1 | C/A<br>2:1 | C/A<br>1:1 | A     |

### Säule 4,5

Verwendung: Reinigung von Diglucosyldiglycerid.  
20g Unisil, 5Std. bei 120°C aktiviert, wurden, in C suspendiert, in die Säule gefüllt (ø 2cm, Höhe 10cm). Aufgebracht wurden ca. 150mg Lipid ( 30mg Glucose), gelöst in C.

#### Elutionsschema ( 1ml/min)

| Fr.Nr.         | 1 | 2          | 3          | 4 | 5 | 6 - 12     |
|----------------|---|------------|------------|---|---|------------|
| Vol. 60ml      |   |            |            |   |   |            |
| Elutionsmittel | C | C/A<br>1:1 | C/A<br>1:2 | A | A | C/M<br>1:1 |

### Säule 6

Verwendung: Abtrennung der Hauptmenge von Diphosphatidylglycerin von den übrigen anionischen Phosphatiden. Vorbereitung, Säulenfüllung und Abmessung wie bei Säule 4, 5 beschrieben. Statt Unisil wurde jedoch Kieselgel, Mallinckrodt, verwendet. Es wurden pro Säule ca. 7mg Lipid -P, in C gelöst, aufgebracht.

#### Elutionsschema ( 1ml/min )

|                |   |      |      |     |     |     |
|----------------|---|------|------|-----|-----|-----|
| Fr.Nr.         | 1 | 2    | 3    | 4   | 5   | 6   |
| Vol. 100ml     |   |      |      |     |     |     |
| Elutionsmittel | C |      | C/M  |     |     |     |
|                |   | 98:2 | 95/5 | 6:1 | 2:1 | 1:1 |

### Säule 7,8

Verwendung: Reinigung von Diphosphatidylglycerin. Unisil 20g, wie bei Säule 4 und 5 vorbehandelt.

#### Elutionsschema ( 2ml/min )

|                |     |      |       |
|----------------|-----|------|-------|
| Fr.Nr.         | 1   | 2    | 3+4   |
| Vol.           | 100 | 100  | je 60 |
| Elutionsmittel | C   | C/M  |       |
|                |     | 95:5 | 2:1   |

### Säule 9

Verwendung: Reinigung von Diphosphatidylglycerin  
Säule 9 entspricht in der Füllung den Säulen 10 - 13; es wurden jedoch 30g Kieselgel - Kieselgur verwendet.

#### Elutionsschema ( 2ml/min )

|                |       |       |     |
|----------------|-------|-------|-----|
| Fr. Nr.        | 1 - 2 | 3 - 8 | 9   |
| Vol. 60ml      |       |       |     |
| Elutionsmittel |       | C/M   |     |
|                | 9:1   | 6:1   | 2:1 |

### Säule 10-13

Verwendung: Trennung von Phosphatidylglycerin und Phosphoglucolipid.

Pro Säule wurden zur Chromatographie von 7mg Lipid-P 24g Kieselgel und 12g Kieselgur nach Vorschrift (11) mit HCl, NaHCO<sub>3</sub> - Lsg. und CO<sub>2</sub>-freiem Wasser behandelt, 12 Std., bei 120°C aktiviert, in C suspendiert, in die Säule gefüllt ( ø 2cm, Höhe 22cm).

#### Elutionsschema ( 2ml/min )

| Fr.Nr.    | 1,2 | 3-7 | 8,9 | 10  | 11  |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Vol.60ml  |     |     |     |     |     |
| Elutions- |     | C/M |     |     |     |
| mittel    | 9:1 | 6:1 | 4:1 | 3:1 | 2:1 |

### Säule 14,16

Verwendung: a) Abtrennung des Phosphoglucolipids von chromatographisch langsamer wandernden Verunreinigungen (Säule 14)

b) Abtrennung des Phosphatidylglycerins von Spuren an Phosphoglucolipid (Säule 16)

Pro Säule ( ø 1cm; Höhe 11cm) wurden 13g eines wie bei den Säulen 10-13 vorbehandelten Gemisches von Kieselgel und Kieselgur verwendet.

#### Elutionsschema ( 1ml/min)

| Fr.Nr.    | 1 - 6 | 7 - 10 |
|-----------|-------|--------|
| Vol. 25ml |       |        |
| Elutions- | C/M   | C/M    |
| mittel    | 6:1   | 5:1    |

### Säule 15

Verwendung: Reinigung von Phosphatidylglycerin (Abtrennung von Spuren an Diphosphatidylglycerin).  
Unisil 20g, wie bei Säule 4 und 5 vorbehandelt.

#### Elutionsschema ( 2ml/min )

| Fr.Nr.    | 1    | 2    | 3   | 4 - 6 |
|-----------|------|------|-----|-------|
| Vol.      | 100  | 50   | 50  | 50    |
| Elutions- | C/M  |      |     |       |
| mittel    | 95:5 | 95:5 | 9:1 | 2:1   |

### Reinigung von Aminoacylphosphatidylglycerin und Identifizierung der Aminosäuren

Die Abtrennung von ninhydrinpositiven Nichtlipiden erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Cellulose (0,25mm Schichtdicke) mit Isobutanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v). Die Aminophospholipide wurden mit J<sub>2</sub> sichtbar gemacht. Die entsprechenden Zonen wurden aus der Schicht ausgekratzt, mit C/M 2:1 eluiert und über eine Fritte (G3) von der Cellulose abgetrennt. Das chromatographische Verhalten wurde in System 2 geprüft.

Für die dünnschichtchromatographische Identifizierung des Phosphatidylglycerinanteils wurden die Aminosäuren selektiv abgespalten. 1ml Aminolipid wurde zur Tr. eingengt und mit 0,05M Boratpuffer pH 9 30Min. geschüttelt. Danach wurde Phosphatidylglycerin mit C/M 2:1 extrahiert. Zur Identifizierung der Aminosäuren wurde das gereinigte Lipid in 6M HCl 12Std. bei 100°C hydrolysiert. Die freigesetzten Aminosäuren wurden auf Cellulose-Platten durch zweidimensionale Trennung im Vergleich mit authentischen Aminosäuren identifiziert (1.Dimension: Elektrophorese in Ameisensäure/Eisessig/Wasser 52:240:17 pH 1,9 1500V, 15mA, 30Min.; 2.Dimension: Chromatographie in Isobutanol/Eisessig/Wasser 4:1:1). Die quantitative Bestimmung erfolgte im Aminosäuren-analysator BC 200.

### Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurde Kieselgel G, Schichtdicke 0,25mm, Laufhöhe 13cm. Die Platten wurden vor dem Lauf 2Std. bei 120°C aktiviert. Fließmittelsysteme:

- 1) C/M/Wasser 140:40:4 (v/v)
- 2) C/M/Wasser 65:35:5 (v/v)
- 3) Diisobutylketon/Eisessig/Wasser 90:50:7 (v/v)

### Färbungen

Lipide wurden durch Joddampf oder Rhodamin G ( 12 ) sichtbar gemacht. Phosphathaltige Verbindungen wurden mit dem Reagens von Dittmer und Lester (13 ), kohlenhydrathaltige Lipide mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure (14) und  $\text{NH}_2$ -haltige Lipide mit dem Ninhydrin - Reagens von Marinetti ( 15 ) identifiziert. Aminosäuren wurden mit einem üblichen Ninhydrin-Reagens gefärbt.

### Analyse der gereinigten Lipide

Die gereinigten Lipide wurden in Chloroform unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Analyse aufbewahrt.

#### a) Wägung

Zur Bestimmung des Lipidgewichts wurden aliquote Teile der Lösungen bei  $65^\circ\text{C}$  auf Aluminiumfolien getrocknet und gewogen (10).

#### b) Quantitative Methoden

Die Messung von Phosphat erfolgte nach Veraschen der Lipide (16). Ester wurden mit einer Hydroxamatmethode bestimmt (17). Zur Messung von Gesamtkohlenhydraten wurde eine Anthronmethode (18) verwendet, wobei für Lipidzucker vorher in 0,1 N methanolischer Natronlauge bei  $65^\circ\text{C}$  verseift, anschließend mit Schwefelsäure neutralisiert und das Lösungsmittel verdampft wurde. Glucose wurde im optischen Test mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glycerin mit Glycerokinase und Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase bestimmt. Zur Messung von Glucose und Glycerin in den Lipiden wurde zunächst ein aliquoter Teil in 0,1 N methanolischer Natronlauge bei  $60^\circ\text{C}$  45 Min. verseift. Nach Neutralisation mit HCl wurde das Lösungsmittel im Vak. entfernt, der Rückstand in einem definierten Volumen 1N HCl aufgenommen und nach Ausäthern der Fettsäuren bei  $100^\circ\text{C}$  hydrolysiert. Dauer für glycosidisch gebundene Glucose: 3 Std. (Verbindung 1,2,6), für Glycerin in Phosphatesterbindung: 240 Std. (Verbindung 4-6).

### Zusammenfassung

- 1) In der vorliegenden Arbeit wird die säulenchromatographische Trennung der Lipide von *Streptococcus lactis* und deren Bausteinanalyse beschrieben.
- 2) Aus den nach Abschluß der Wachstumsphase geernteten Bakterien wurde das Rohlipid mit Chloroform - Methanol extrahiert. Durch Chromatographie über Sephadex wurden wasserlösliche Verunreinigungen entfernt.
- 3) Im gereinigten Extrakt waren dünnenschichtchromatographisch neben Pigmenten und aminosäurehaltigen Nichtlipiden zwei Glykolipide, ein Aminophospholipid, zwei ninhydrinnegative Phosphatide und ein Phosphoglykolipid nachweisbar.
- 4) Die Primärfractionierung erfolgte über DEAE - Cellulose durch kombinierte Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie. Bei Elution mit einem diskontinuierlichen Chloroform - Methanol - Gradienten wurden neben einer wenig polaren nicht näher untersuchten Fraktion die beiden Glykolipide und das Aminophospholipid getrennt erhalten: Zusatz von Ammoniumacetat führte zur gemeinsamen Elution der übrigen rein anionischen Phosphatide.
- 5) Die beiden Glykolipide wurden durch Chromatographie über Kieselgel weiter gereinigt. Die molaren Verhältnisse der Bestandteile waren für ein Mono- und Diglucosyldiglycerid charakteristisch.
- 6) Das Aminophospholipid wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie von den aminosäurehaltigen Nichtlipiden getrennt. Die molaren Verhältnisse der Bausteine ließen ein Aminoacylphosphatidylglycerin mit Lysin als hauptsächlicher Aminosäure erwarten.
- 7) Die Trennung der anionischen Phosphatide erfolgte durch wiederholte Chromatographie über einfaches und mit Natriumbicarbonat behandeltes Kieselgel
- 8) Zwei dieser Verbindungen waren nach ihrer molekularen Zusammensetzung als Phosphatidylglycerin und Diphosphatidylglycerin zu betrachten.

Die dritte, bisher nicht beschriebene Verbindung enthielt Glucose, Glycerin, Phosphat und Ester im molaren Verhältnis von 2 : 2 : 1 : 3.

- 9) Die bei der Bausteinanalyse für alle Verbindungen mit nahezu großer Annäherung gefundenen, ganzzahligen Verhältnisse sowie die Übereinstimmung der berechneten und ermittelten Molekulargewichte beweisen neben der chromatographischen Einheitlichkeit die Reinheit der getrennten Verbindungen.

Literatur

- 1) Fischer, W. und Seyferth, W.,  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 1662 (1968)
- 2) Ishizuka, J. and Yamakawa, T., J. Biochem., 64, 13 (1968)
- 3) Shaw, N. and Baddiley, J.,  
Nature, 217, 124 (1968)
- 4) Vorbeck, M. L. and Marinetti G. V.,  
Biochemistry 4, 296 (1965)
- 5) Op den Kamp, J. A. F., Redai, I. u. van Deenen, L. L. M. J.,  
Bacteriol. 99, 298 (1969)
- 6) 7th international symposium on the chemistry of  
natural products. C 21, 314
- 7) Fischer, W.,  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 731 (1970)
- 8) Mc Farlane  
Nature (London) 196, 136 (1962)
- 9) Wells, M. A. and Dittmer, J. C.,  
Biochemistry 2, 1259 (1963)
- 10) Kritchevsky, G. and Yamamoto, A. in G. Marinetti:  
Lipid Chromatographic Analysis, Vol. 1, S. 108, Marcel Dekker  
Inc. New York
- 11) Okuyama, H. and Nojima, S.,  
J. Biochem. 57, 529 (1965)
- 12) Rouser, G. Kritchevsky, G., Heller, D. and Lieber, E.,  
J. Amer. Oil Chemists Soc. 42, 215 (1965)
- 13) Dittmer, J. C. and Lester, R. L.,  
J. Lipid Res., 5, 126 (1965)
- 14) Jacin, H. and Mishkin, A. R.,  
J. Chromatogr. 18, 170 (1965)
- 15) Marinetti, G. V.,  
J. Lipid Res. 3, 1 (1962)
- 16) Schnitger, H., Papenberg, K., Gause, E., Czok, R., Büchner, Th.,  
and Adam, H.,  
Biochem. Z., 332, 167 (1959)
- 17) Rapport, M. M. and Alonzo, N.,  
J. Biochem. 217, 193 (1965)



## Lebenslauf

Am 17.1.1942 wurde ich, Rolf Dieter Schmid, als erster Sohn des Kurarztes Dr. Adolf Schmid und seiner Frau Helene, geb. Hoffmann, in Nürnberg geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Bad Reichenhall. Ab 1952 besuchte ich dort das Karlsgymnasium, wo ich 1962 als Realgymnasiast das Abitur bestand.

Nach zwei Jahren Militärdienst wurde ich 1964 als Leutnant der Reserve entlassen.

Mein Studium begann ich in Erlangen im Wintersemester 1964/65 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät. Seit dem Sommersemester 1965 bin ich Student der Medizin. Das Vorphysikum habe ich im Wintersemester 1965/66 das Physikum im Sommersemester 1967 und das medizinische Staatsexamen im Wintersemester 1970/71 in Erlangen abgelegt.

Seit September 1967 arbeitete ich im Physiologisch-Chemischen-Institut der Friedrich-Alexander Universität unter der Leitung von Herrn Doz.Dr.W.Fischer an der vorliegenden Dissertation.

Ab 1. März werde ich als Medizinalassistent am Städtischen Krankenhaus in Landsberg arbeiten.





## **Offsetdruck-Fotodruck**

**J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990**